

# Evaluation of ischemic injury in donor kidneys : an experimental study

Citation for published version (APA):

Maessen, J. G. (1988). *Evaluation of ischemic injury in donor kidneys : an experimental study*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19880916jm>

## Document status and date:

Published: 01/01/1988

## DOI:

[10.26481/dis.19880916jm](https://doi.org/10.26481/dis.19880916jm)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## SUMMARY

This thesis presents the results of experimental studies on the evaluation of ischemic injury in kidneys for transplantation. During harvesting and transplantation of kidneys a number of situations arise in which ischemia may occur. Especially kidneys from donors with circulatory arrest (non-heartbeating donors) may have suffered from a considerable period of warm ischemia. Posttransplant viability of kidneys is negatively influenced by ischemia. The extent and effect of ischemic injury often remains obscure and only becomes evident some time after implantation. Mechanisms were studied that are likely to determine the effect of ischemia on renal viability in order to obtain parameters for monitoring ischemic injury. Three major points of interest were considered: the cellular energy metabolism, enzyme leakage from damaged cells and the involvement of inflammatory processes.

In part I data from the experimental studies are introduced and discussed in view of these points of interest and with respect to the results from previous studies by others on the same subject. Chapter 1, 2, and 3 are dealing with the cellular energy metabolism, enzyme leakage from damaged cells, and inflammatory processes, respectively.

In part II the experimental studies are presented separately, in a similar fashion as they have been published or submitted for publication. Chapter 4 describes the development of a test to determine warm ischemia time in donor kidneys. In dog the concentrations of energy metabolites after various periods of warm ischemia were measured. Small changes in temperature affect the break down of adenine nucleotides. The ratio of the renal tissue content of adenine nucleotides and degradation products during ischemia correlates with the length of ischemia time. Tissue specimen for biochemical assessment of these metabolites can be harvested with a simple surgical wedge biopsy technique. Possible clinical application of this test is discussed.

Chapter 5 describes the effect of hypothermic storage on the loss of adenine nucleotides in canine kidneys during ischemia. The loss of these metabolites is highest in kidneys with high levels of adenine nucleotides before hypothermia is started. A nadir level of adenine nucleotide tissue content is reached after 72 hours of hypothermia irrespective of prior warm ischemic injury. Assessment of the adenine nucleotide content during hypothermia does not allow the estimation of prior warm ischemia time without additional information.

Chapter 6 describes the effectiveness of total body cooling as a method to initiate preservation in a study in rats. Body cooling from  $37^{\circ}\text{C}$  to  $9.2^{\circ}\text{C}$  within one hour, considerably reduces the loss of adenine nucleotides in kidneys following circulatory arrest. A simple and non-invasive method to initiate preservation, like total body cooling, may avoid technical and legal problems in harvesting non-heartbeating donor kidneys.

Chapter 7 describes the effect of warm ischemia with or without subsequent cold storage on the concentration of energy metabolites in renal tissue during reperfusion. The adenine nucleotide concentration increases within 1 hour of *in situ* perfusion dependent on prior warm ischemia time. Following warm ischemia and 48 hours cold storage no net increase is observed after 1 hour reperfusion. The combination of cold storage and warm ischemia prolongs the depletion of the adenine nucleotide pool. There is no evidence that locally accumulated degradation products are involved in the resynthesis of adenine nucleotides. The ability to resynthesize ATP is maintained.

Chapter 8 describes a modified HPLC technique to determine tissue levels of 19 metabolic substances including adenine nucleotides, guanine nucleotides and a number of degradation products in renal tissue. Tissue specimen as small as 5 mg of tissue wet weight are large enough to meet analytical demands. The intra and inter-assay coefficient of variance remains within acceptable limits. The concentration of nucleotides in cortical tissue is similar in human and canine kidneys.

Chapter 9 describes the relationship between early and late recovery of adenine nucleotides concentrations following ischemia and postischemic life sustaining function of kidneys. Kidneys after 90 minutes of ischemia are different from kidneys after 30 minutes of ischemia as appears from a depressed recovery of tissue adenine nucleotide concentration and lack of life sustaining function. Five days after ischemia, however, the concentration of adenine nucleotide in kidneys with 90 minutes of ischemia is similar as in kidneys with 30 minutes of ischemia. These kidneys recover to life sustaining function albeit only after five weeks. During this period processes other than the adenine nucleotide homeostasis determine the lack of life sustaining function.

Chapter 10 describes the adenine nucleotide homeostasis and viability of kidneys after warm ischemia and cold storage with or without an intermediate normothermic perfusion half-way the storage period. This treatment has a nucleotide sparing effect and improves posttransplant viability of kidneys. It is further described that flushing with Eurocollins induces a loss of adenine nucleotides which is larger than might be expected from cooling in ischemic conditions per se.

Chapter 11 describes the transport of extracellular cytosolic enzyme activity from renal tissue. Enzymes injected in parenchyma from canine kidneys, were rapidly and almost completely recovered in the blood compartment and not in the urinary compartment. A similar recovery in plasma is observed if the injections are performed in ischemically damaged tissue. Spontaneous release of enzyme activity following renal ischemia causes an increase in plasma enzyme activity and a negligible accumulation of enzyme activity in urine. Quantitative estimation of cytosolic enzyme leakage from ischemically damaged renal tissue should be based on changes in plasma enzyme activity.

Chapter 12 describes the relationship between the loss of enzyme activity from ischemically damaged renal tissue and changes in plasma enzyme activity. The cumulative amount of enzyme activity that enters the vascular compartment during a period of time was calculated according to a two-compartment model for circulating proteins. The total activity of AST that is recovered in plasma during 48 hours represents about 90% of the AST activity that is lost from ischemic renal tissue during this time. It is concluded that the depletion of renal tissue enzyme activity following ischemia can be estimated from changes in plasma AST activity. To allow proper calculation of the cumulative amount of enzyme activity in plasma, frequent blood sampling during the first 24 hours after ischemia is necessary. Differences in enzyme recovery in plasma following either permanent ischemia or transient ischemia with reperfusion suggest that reperfusion is associated with an additional increase in renal tissue enzyme loss.

Chapter 13 describes the relationship between renal tissue enzyme leakage and irreversible cell damage. Following 90 minutes of ischemia the renal tissue enzyme activity is reduced to about 50% during 48 hours. The renal tissue adenine nucleotide content, however, is near normal within 24 hours after the start of reperfusion. There is no evidence that a compensatory mechanism induces supranormal adenine nucleotide levels

following ischemia. These data therefore suggest that in contrast to what is generally accepted in heart tissue, ischemic renal cells may lose enzyme activity without being irreversibly damaged.

Chapter 14 describes the effect of cytokines on renal tubular cells in vitro. Cytokines are involved in inflammatory processes and may induce killing of tumour cells and microorganisms. It is shown that IL1 and IFN- $\gamma$  exert cytotoxic properties on normal kidney cells in vitro. The combined action of these cytokines induces cytolysis. Such mechanisms may play a role in ischemia and rejection associated inflammation.

Chapter 15 describes the interaction of inflammation and ischemic renal injury in rat. Stimulation of inflammatory reactions with LPS exacerbates renal failure following renal ischemia. The combination of renal ischemia and the stimulation of inflammatory reactions also have a generalized effect as fifty percent of the animals die. In animals without renal ischemia LPS induces neither renal failure nor mortality. Treatment with LPS causes an increase in circulating levels of TNF. Treatment of animals with human recombinant TNF instead of LPS following renal ischemia induces similar renal and generalized complications as in LPS treated animals. TNF may play a role in ischemia-inflammation associated injury as in "reperfusion injury", gramnegative sepsis, and multiple organ failure. Furthermore, these data suggest a new, important field of interest for those looking for better and more rational preservation techniques.

## SAMENVATTING

Het huidige tekort aan donor nieren zou deels kunnen worden ondervangen door ook nieren van donoren met een circulatie stilstand te gebruiken. Het mogelijke ontstaan van ischemische schade met een onbekende ernst in nieren van dergelijke donoren, staat grootschalig gebruik van deze nieren in de dagelijkse praktijk in de weg. In dit proefschrift zijn een aantal experimentele studies gebundeld met als thema de betekenis van ischemische schade voor de viabiliteit van de donor nier en de wijze waarop de omvang van de ischemische schade zou kunnen worden gemeten. Dit thema werd vanuit een drietal invalshoeken benaderd, te weten het cellulaire energie metabolisme, enzym verlies uit ischemisch beschadigde cellen, en de rol van inflammatoire processen bij het ontstaan van schade door ischemie.

In deel I van van dit boek worden in respectievelijk hoofdstuk 1,2 en 3, de resultaten uit het experimentele werk beproven in het licht van deze drie invalshoeken en tegen de achtergrond van resultaten uit onderzoek van anderen.

In deel II, hoofdstuk 4 tot en met 15, worden experimentele studies afzonderlijk weergegeven in de vorm waarin ze zijn gepubliceerd of ter publicatie zijn aangeboden.

Hoofdstuk 4 beschrijft een methode om de warme ischemie tijd in donor nieren vast te stellen. Uit studies in het hondemodel blijkt de ratio van de adenine nucleotide concentratie en de concentratie van afbraakproducten in nierweefsel te corresponderen met de duur van de ischemie. Veranderingen in temperatuur dienen betrokken te worden in de interpretatie van deze ratio. Wat betreft mogelijke klinische toepassing is het van belang dat de genoemde metabolieten kunnen worden bepaald in eenvoudig uit de nier te nemen corticale wigbiopten.

Hoofdstuk 5 is een studie over het effect van hypothermie op de afbraak van adenine nucleotiden in honde nieren tijdens ischemie. De daling van de adenine nucleotide concentratie is sterker naarmate de concentratie voor het begin van de hypothermie hoger is. Na 72 uur koude preservatie ( $4^{\circ}\text{C}$ ) wordt in alle nieren een zelfde adenine nucleotide concentratie bereikt ongeacht het effect van de beginconcentratie. Veranderingen van de beginconcentratie door warme ischemie zijn daardoor moeilijk vast te stellen aan de hand van de adenine nucleotide concentratie tijdens hypothermie. Hoofdstuk 6 beschrijft in een studie in het rattemodel, de effectiviteit van totale lichaamskoeling als methode om koude preservatie te starten. Het verlagen van de lichaamstemperatuur van  $37^{\circ}\text{C}$  tot  $9.2^{\circ}\text{C}$  binnen een uur geeft een reële vermindering van het adenine nucleotide verlies dat optreedt in nieren na het intreden van een circulatie stilstand. Met een dergelijke eenvoudige en niet invasieve methode om orgaan preservatie te starten zouden technische en juridische problemen rond potentiële non-heartbeating donoren kunnen worden vermeden.

Hoofdstuk 7 beschrijft het herstel van het adenine nucleotide metabolisme tijdens herstel van de circulatie na voorafgaande preservatie en warme ischemie. Zonder preservatie neemt de adenine nucleotide concentratie tijdens een uur in situ perfusie toe afhankelijk van de warme ischemie tijd. Na 48 uur preservatie is een dergelijke relatie niet aantoonbaar. Er is geen toename van de adenine nucleotide concentratie binnen een uur. Het vermogen om ATP te resynthetiseren lijkt in alle gevallen behouden. Een rol voor de degradatie producten als nucleotide precursor is niet aantoonbaar.

Hoofdstuk 8 beschrijft een gemodificeerde HPLC methode waarmee de concentratie

van 19 metaboliëten waaronder adenine nucleotiden, guanine nucleotiden en een aantal degradatie producten van deze stoffen in nierweefsel kan worden gemeten. Slechts 5 mg weefsel op natgewicht basis is nodig voor een accurate bepaling. Zowel de inter-assay intra-assay variatie coëfficiënt is acceptabel voor de bedoelde toepassing. De concentratie van nucleotiden in corticaal nierweefsel is in humane nieren vergelijkbaar met die in hondenieren.

Hoofdstuk 9 beschrijft de relatie tussen het herstel van het adenine nucleotide metabolisme en de zogenaamde life sustaining functie van nieren na ischemie. Verlenging van de warme ischemie tijd van 30 naar 90 minuten veroorzaakt een sterk verminderde toename van nucleotiden in het eerst uur na reperfusie en het uitblijven van life sustaining functie. Vijf dagen na het aanbrengen van de ischemie is het verschil tussen nieren met 30 en 90 minuten ischemie verdwenen wat betreft de weefsel adenine nucleotide concentratie. Als nieren na 90 minuten ischemie vijf weken de tijd krijgen om te herstellen blijkt ook de life sustaining functie te zijn teruggekeerd. Andere factoren dan alleen het adenine nucleotide metabolisme zijn waarschijnlijk verantwoordelijk voor dit trage functie herstel.

Hoofdstuk 10 beschrijft de adenine nucleotide homeostase en de life sustaining functie van nieren na warme ischemie en preservatie met of zonder een kortdurende perfusie van de nier met bloed bij lichaamstemperatuur halverwege de preservatie periode. De tussentijdse perfusie vermindert het adenine nucleotide verlies tijdens preservatie en lijkt de life sustaining functie te verbeteren. Daarnaast wordt beschreven hoe de spoel procedure met Eurocollins aan het begin van de preservatie een sterker verlies van adenine nucleotiden veroorzaakt dan op basis van alleen de ischemie duur en de temperatuursverlaging tijdens deze procedure, zou mogen worden verwacht.

Hoofdstuk 11 beschrijft de transportweg van enzymen die buiten de cel zijn geraakt. Enzymen die door middel van infusies in nier parenchym zijn gebracht worden snel en vrijwel compleet in het bloed aangetroffen en niet in de urine. Ook in ischemisch beschadigd weefsel volgen geïnfundeerde enzymen deze weg. Overeenkomstig deze bevindingen blijken na nier ischemie, in kwantitatief opzicht, wel belangrijke veranderingen in de enzym activiteit in plasma op te treden maar niet in de urine. De kwantitatieve bepaling van cytosolische enzym verlies na nier ischemie dient daarom uit te gaan van veranderingen in de plasma enzym activiteit.

Hoofdstuk 12 beschrijft de relatie tussen enzym verlies uit de nier na ischemie enerzijds en de veranderingen in plasma enzym activiteit in dezelfde tijd anderzijds. De totale hoeveelheid enzym activiteit die gedurende een bepaalde periode in het bloed verschijnt kan worden berekend aan de hand van een twee-compartimenten model voor circulerende eiwitten. De totale hoeveelheid AST die gedurende 48 uur na ischemie in het bloed accumuleert komt overeen met ongeveer 90% van het verlies aan AST uit het weefsel in dezelfde periode. Het enzym verlies uit ischemisch nier weefsel lijkt goed te kunnen worden berekend aan de hand van veranderingen in de plasma enzym activiteit. Deze berekening vergt het frequent nemen van bloedmonsters gedurende vooral de eerste 24 uur. Verschillen in enzym verlies in nieren met permanente ischemie en in nieren met ischemie en reperfusie, suggereren dat tijdens reperfusie een additionele schade optreedt.

Hoofdstuk 13 beschrijft de relatie tussen enzym verlies uit nierweefsel en het optreden van irreversibele cel schade. De weefsel enzym activiteit in de nier na 90 minuten

ischemie neemt in een daaropvolgende periode van 48 uur met ongeveer 50% af. De adenine nucleotide concentratie daarentegen, is aanvankelijk verlaagd maar na 24 uur alweer bijna terug op een pre-ischemisch niveau. Controle experimenten maken het onwaarschijnlijk dat een compensatie mechanisme supra-normale adenine nucleotide concentraties veroorzaakt in een deel van het nierweefsel. Daarom lijkt de conclusie gerechtvaardigd dat ischemische niercellen enzymen kunnen verliezen zonder irreversibel beschadigd te zijn.

Hoofdstuk 14 beschrijft het directe effect van een tweetal cytokines op renale tubulus epitheel cellen in vitro. Cytokines spelen een rol in ontstekings processen en kunnen verantwoordelijk zijn voor de vernietiging van tumorcellen en micro-organismen. IL1 en IFN- $\gamma$  blijken ook cytotoxisch te zijn voor normale nier parenchym cellen. De combinatie van IL1 en IFN- $\gamma$  veroorzaakt cytolyse van deze cellen. Mogelijk spelen deze eigenschappen van de cytokines een rol in het uiteindelijke effect van ontstekingen die optreden tijdens ischemie en rejectie.

Hoofdstuk 15 tenslotte beschrijft de wisselwerking tussen ischemische schade en ontstekings processen na nier ischemie in de rat. Stimulatie van ontstekings processen met LPS verergert het nierfunctie verlies na nier ischemie. De combinatie van nier ischemie en LPS behandeling leidt ook tot een gegeneraliseerd effect zoals blijkt uit een mortaliteit van 50%. In dieren zonder nier ischemie leidt LPS noch tot nierfunctie verlies noch tot mortaliteit. LPS veroorzaakt een stijging van de TNF plasmaspiegel. Behandeling van dieren met humaan recombinant TNF in plaats van LPS, leidt in combinatie met nier ischemie tot dezelfde nierafwijkingen en gegeneraliseerde complicaties als behandeling met LPS. De suggestie wordt daarmee gewekt dat endogeen TNF een belangrijke rol speelt in schade door ontstekingsprocessen in combinatie met ischemie. Deze experimentele gegevens zijn niet alleen van belang in het licht van klinische problemen als gram negatieve sepsis en multiple organ failure maar geven ook inzicht in de implicatie op termijn van ischemische schade in donor nieren en suggereren een belangrijk nieuw aandachtsveld binnen het onderzoek naar betere preservatie methoden.